

Über das Verhalten freier und an Protoplasma gebundener Hefenenzyme.¹⁾

Von

Hans Euler und Sixten Kullberg.

Mit sieben Figuren im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. Mai 1911.)

In bezug auf Wirksamkeit, Löslichkeit und Verhalten gegen anästhetisierende Mittel bestehen zwischen den kohlenhydrat-spaltenden Hefenenzymen, der Zymase (im weiteren Sinne), der Maltase und der Invertase erhebliche und anscheinend sehr wesentliche Unterschiede. Es soll in der vorliegenden Mitteilung gezeigt werden, daß die Versuchsergebnisse, welche hinsichtlich dieser drei Enzyme vorliegen, sich von einem gemeinsamen Gesichtspunkt aus darstellen lassen.

Wir geben zuerst eine Zusammenfassung der hierher gehörenden Tatsachen.

I. Zymase.

Lebende Hefezellen vergären Glukose unter folgenden Bedingungen.²⁾

Die Gärung verläuft um so schneller, je verdünnter die Zuckerlösung ist. Nach Aberson verhält sich die Geschwindigkeit in 14%iger Glukoselösung zu der in 8,5%iger Lösung wie 64,4 zu 93,3. Nach Slator³⁾ besteht ein Maximum der Geschwindigkeit in 4%iger Lösung.

Damit steht in Zusammenhang, daß die Formel für Reaktionen erster Ordnung nicht zutrifft, sondern daß die nach

¹⁾ Z. T. aus Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 4, Nr. 13, 1911.

²⁾ Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, Bd. 22, S. 78, 1903.

³⁾ Journ. Chem. Soc., Bd. 89, S. 133, 1906.

dieser Formel berechneten Konstanten mit fortschreitender Reaktion wachsen. Aberson nimmt an, daß die Formel

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$$

für die Gärung allgemein gültig ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist angenähert proportional der angewandten Hefemenge (l. c., S. 85).

In bezug auf die vorstehenden Resultate muß folgendes betont werden:

Aberson hat die Gärungsgeschwindigkeit auf optischem Wege, durch Beobachtung der Drehungsänderung der Zuckermessung gemessen. Er hat angenommen, daß er damit die Mengen der bei der Reaktion verbrauchten Glukose ermittelt, und daß dieselben streng proportional sind mit der Menge der auftretenden Kohlensäure. Eine einfache Überlegung¹⁾ zeigt, daß dies nicht der Fall zu sein braucht, wenn man das Auftreten eines Zwischenproduktes berücksichtigt (Buchner und Meisenheimer), dessen Existenz zwar noch nicht bewiesen, aber wahrscheinlich geworden ist. Wenn nämlich ein Zwischenprodukt in meßbarer Konzentration auftritt, so kann dies nur dadurch geschehen, daß mehr Zucker gespalten wird, als der entwickelten Menge von Kohlensäure entspricht, und diese Abweichung von der Proportionalität zwischen verbrauchtem Zucker und gebildeter Kohlensäure muß sich so lange geltend machen, als ein Zwischenprodukt in der Lösung besteht. Wie Versuche, die der eine von uns mit Herrn Dr. Fodor ausgeführt hat, zeigen, tritt tatsächlich eine erhebliche Differenz auf zwischen dem Rückgang der optischen Drehung einerseits und der entwickelten Kohlensäuremenge anderseits. Die Versuche von Aberson liefern also kein vollständiges Bild der Gärungsgeschwindigkeit; vielmehr geben sie, unter Voraussetzung, daß das Zwischenprodukt der Gärung optisch inaktiv ist, die Reaktionsgeschwindigkeit: Zucker — Zwischenprodukt. Dieser Vorgang wird zweifellos sekundär durch den weiteren Zerfall des

¹⁾ H. Euler und B. af Ugglas, Zeitschrift f. allgem. Physiologie, Bd. 12, S. 364; 1911.

Zwischenproduktes beeinflusst. Mißt man die Entwicklung der Kohlensäure, so bestimmt man dadurch die Geschwindigkeit:

Zwischenprodukt \rightarrow Alkohol + CO_2 , welche ihrerseits durch die Bildungsgeschwindigkeit des Zwischenproduktes beeinflusst wird.

Es ist also von vornherein nicht zu erwarten, daß die nach den bisher angewandten Methoden gemessene Zuckerspaltung durch lebende Hefe, Dauerhefe oder Hefepreßsaft sich als einfache Reaktion erster Ordnung darstellen läßt.

Einfluß von Toluol, Thymol und Chloroform auf die Gärung der lebenden Hefe.

Die Gärung der lebenden Hefe wird durch anästhetisierende Mittel schnell und fast vollständig aufgehoben. Jedoch trat bei unserer Hefe anfangs eine, allerdings geringe, Kohlensäureentwicklung ein.

1 g abgepreßte Hefe + 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung.

| | Ohne Chloroform | Mit 1 ccm Chloroform | Mit Thymol |
|--------------------------------|-----------------|----------------------|------------|
| g CO_2 in 120 Minuten | 0,2038 | 0,0105 | 0,0110 |

Die geringfügige, aber immerhin meßbare Kohlensäureentwicklung, die in Gegenwart von Chloroform und Thymol eintrat, blieb auch dann nicht aus, wenn die Hefe vor dem Zuckerezusatz mit dem betreffenden Antiseptikum behandelt wurde.

0,25 g Hefe + 25 ccm H_2O + 1 ccm Chloroform. Bleibt nach dem Umschütteln 30 Minuten stehen. Hierauf Zusatz von 4 g Rohrzucker.

| | g Kohlensäure |
|--------------------------------|---------------|
| Nach 38 Minuten | 0,0115 |
| Nach weiteren 28 Stunden . . . | 0,0125 |

Auch Toluol übt eine ähnliche Wirkung aus, wie die beiden folgenden Versuchspaare zeigen. (Fig. 1 a.)

I. 0,5 g abgepreßte Hefe + 2 g Glukose + 25 ccm 2%iger NaH_2PO_4 .

- a) Ohne Toluol
- b) Mit 2 ccm Toluol.

II. 0,5 g abgepreßte Hefe + 2 g Glukose + 25 ccm Wasser.

- a) Ohne Toluol
- b) Mit 2 ccm Toluol.

In Gegenwart von Toluol bleibt also höchstens etwa 1% der Gärwirkung erhalten, auch dieser Rest verschwindet nach einigen Stunden.

Einfluß von NaH_2PO_4 .

Aus der Figur 1a geht gleichzeitig hervor, daß die Gärung unserer Hefe H durch 2%iges NaH_2PO_4 beschleunigt wird und zwar um etwa 25%. Es entspricht dies früher von uns an der gleichen Hefe gewonnenen Ergebnissen.

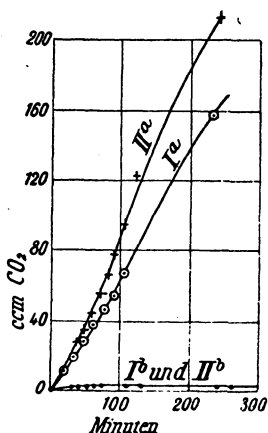


Fig. 1a.

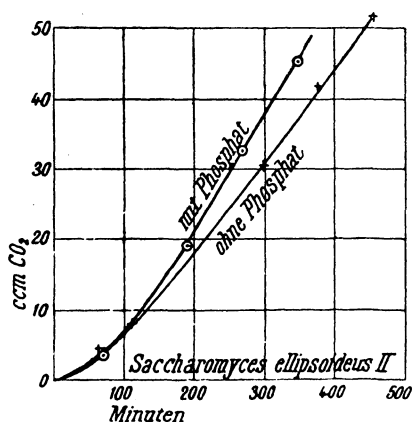


Fig. 1b.

Wir haben auch einige Versuche über den Einfluß von NaH_2PO_4 auf andere Hefearten angestellt.

Versuch mit *Saccharomyces ellipsoideus*.

0,5 g *Saccharomyces ellipsoideus* II (abgepreßt, drei Monate alte Kultur aus mit Rohrzucker versetzter Nährlösung) + 25 ccm 8%iger Glukoselösung. Im Parallelversuch war die Lösung 2%ig in bezug auf NaH_2PO_4 . Siehe Fig. 1b.

Die Beschleunigung durch das saure Phosphat erwies sich hier etwas geringer als bei unserer Bierhefe H.

Versuch mit *Saccharomyces thermantitonus*.

Die Hefe war in Hefewasser kultiviert worden unter Zusatz von 1% Glukose.

0,5 g Hefe + 25 ccm 8% ige Glukoselösung. Im Parallelversuch war die Lösung 2% ige in bezug auf NaH_2PO_4 . Siehe Fig. 1 c.

Die Beschleunigung ist etwa die gleiche wie bei unserer Bierhefe H.

Gärung durch Trockenhefe.

Beim Trocknen bleibt bekanntlich ein Teil der Zymase aktiv, auch wenn die so gewonnenen Dauerpräparate ganz steril sind. Da keine Angaben darüber vorliegen, welcher Anteil der Gärwirkung sich bei vorsichtigem Entwässern erhalten läßt,¹⁾ geben wir hier einige Versuche an.

Bei denselben kam die Hefe teils frisch abgepreßt zur Anwendung, teils nach dem Trocknen. Die Trocknung geschah im Vakuum unter 40° ; hierauf folgte eine etwa halbstündige Erhitzung auf etwa 90° .

0,25 g abgepreßte Hefe in 25 ccm 8% iger Glukoselösung:

| | Ungetrocknet | Nach dem Trocknen | Verhältnis |
|--------------------------------|--------------|-------------------|------------|
| g CO_2 nach 4 Stunden | 0,0620 | 0,0038 | 16 |
| „ „ „ 20 „ | 0,3254 | 0,0090 | 36 |

1 g abgepreßte Hefe in 20 ccm 10% iger Rohrzuckerlösung:

| | Ungetrocknet | Nach dem Trocknen | Verhältnis |
|---|--------------|-------------------|------------|
| Vers. a) g CO_2 nach 2 Stunden | 0,3200 | 0,0110 | 30 : 1 |
| „ b) „ „ „ 2 „ | 0,1937 | 0,0140 | |
| „ c) „ „ „ 2 „ | 0,1939 | 0,0140 | 14 : 1 |

¹⁾ Quantitative Untersuchungen hat Buchner (Zymasegärung, S. 252) nur in der Weise angestellt, daß einerseits die Gärkraft des Preßsaftes eines Trockenpräparates mit dem Preßsaft aus frischer Hefe verglichen wurde, wobei natürlich die unvermeidlichen Versuchsfehler groß sein müssen.

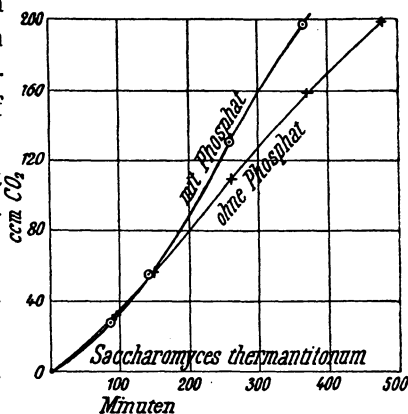


Fig. 1 c.

1 g abgepreßte Hefe (2—3 Stunden vorbehandelt mit neutralisiertem KH_2PO_4) in 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung:

| | Ungetrocknet | Nach dem Trocknen | Verhältnis |
|---|--------------|-------------------|------------|
| Vers. a) g CO_2 nach 2 Stunden | 0,2345 | 0,0087 | 27 : 1 |
| » b) » » » 2 » | 0,2236 | 0,0094 | 25 : 1 |

1 g abgepreßte Hefe (2—3 Stunden vorbehandelt mit KH_2PO_4) in 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung:

| | Ungetrocknet | Nach dem Trocknen | Verhältnis |
|---|--------------|-------------------|------------|
| Vers. a) g CO_2 nach 2 Stunden | 0,2231 | 0,0137 | 16 : 1 |
| » b) » » » 2 » | 0,2395 | 0,0172 | 14 : 1 |

Bei sehr vorsichtiger Entwässerung durch Trocknung ließ sich also höchstens $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{30}$ der Zymase wirksam erhalten.

Bei der Entwässerung unserer Hefe mit Alkohol und Äther wurde die Gärwirkung noch mehr geschwächt als durch das Trocknen im Vakuum.

Eine Tötung der Hefe wurde auch bei der Temperatur der flüssigen Luft vorgenommen.

2 verschlossene Kölbchen mit je 0,5 g abgepreßter Hefe (Wassergehalt 62%) wurden während einer halben Stunde in ein Bad von flüssiger Luft gestellt. Dann wurden die Kölbchen auf Zimmertemperatur gebracht und gleichzeitig mit 2 anderen, nicht abgekühlten, mit 20 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung versetzt. Die Kohlensäureentwicklung wurde volumetrisch verfolgt.

Tabelle 1.

| Minuten | ccm CO_2 | |
|---------|-------------------|----------------------|
| | gefrorene Hefe | nicht gefrorene Hefe |
| 50 | 1 | 31 |
| 100 | 2 | 62 |
| 200 | 5 | 127 |

Durch eine halbstündige Abkühlung auf etwa -180° wird also die Hefe stark geschwächt, aber nicht vollkommen getötet.

Anästhetisierende Mittel.

Durch mechanisches Zerreiben der Hefezellen mit Sand und Kieselgur ist es bekanntlich Buchner gelungen, einen zellfreien, gärungskräftigen Saft darzustellen. Die Gärwirkung dieses Saftes wird durch Zusätze von Toluol fast nicht, durch Thymol und Chloroform wenig beeinflusst.

Es wäre demnach zu erwarten gewesen, daß auch die Gärkraft der Trockenhefe durch die genannten antiseptischen Stoffe nur wenig vermindert wird. Indessen zeigte sich eine auffallend starke Beeinflussung.

I. Thymol. Bierhefe im Passburgschen Vakuumapparat unter 40° vollständig entwässert. Dann während 2 Stunden bei ansteigender Temperatur ($50-100^{\circ}$) erhitzt.

0,25 g dieser Dauerhefe + 20 ccm 10 %iger Rohrzuckerlösung:

| | | |
|-----------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| | + 5 ccm Wasser | + 5 ccm Thymolwasser (gesättigt) |
| Menge CO_2 in 14 Stunden | 0,0080 g | 0,0026 g |

II. Toluol. 1 g Trockenhefe + 25 ccm 8 %iger Glukoselösung + 2 ccm Toluol bei $30,6^{\circ}$. (Siehe folgende Figur 2.)

Die Einwirkung des als «Gift» wirkenden Toluols macht sich vom Beginn der Reaktion an geltend, der Vergiftungsgrad ist aber nicht konstant, sondern nimmt mit fortschreitender Reaktion zu.

Da die im Vakuum getrocknete Hefe selten ganz steril ist und also die Möglichkeit vorlag, daß ein nicht zu vernachlässigender Anteil des Hefepräparates noch lebensfähige Zellen enthielt, so haben wir dieses Präparat während einer halben Stunde mit absolutem Alkohol behandelt. Nach dem Abpressen und Trocknen wurde dann ein

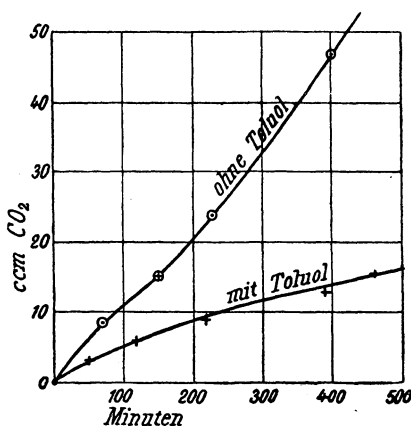


Fig. 2.

Versuch ganz in der gleichen Weise angestellt wie der zuletzt beschriebene. Das Ergebnis desselben geht aus den Kurven der Fig. 3 hervor. Toluol übt also auch auf vollkommen sterile Trockenhefe eine stark hemmende Wirkung aus.

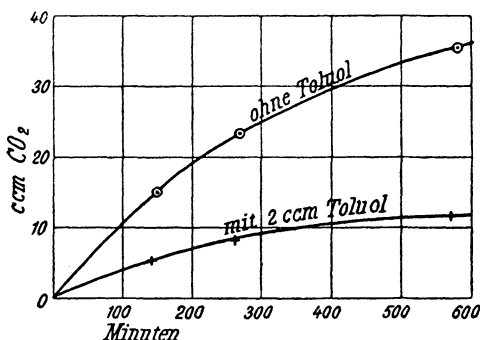


Fig. 3.

II. Maltase.

In bezug auf die Maltosespaltung durch Hefe sind die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen sehr auseinandergegangen. Die genauesten Angaben verdanken wir E. Fischer.¹⁾

Feuchte, unverletzte Hefe spaltet in Gegen-

wart von viel Chloroform- α -Methylglukosid; in Chloroformwasser betrug die Glukosidspaltung durch Saaz-Hefe 25 %, während eine Froberg-Hefe keine Spaltung bewirkte. Maltose wird in Chloroformwasser von keiner lebenden Hefe gespalten. In Gegenwart anderer Antiseptika trat sowohl in Maltoselösungen als in α -Methylglukosidlösungen Spaltung ein.

Nach eigenen Versuchen mit Unterhefe der hiesigen St. Eriks-Brauerei verhält sich die lebende Hefe gegenüber Maltose folgendermaßen:

0,5 g Hefe in 25 ccm 8 % iger Maltoselösung: Reaktionszeit: 260 Minuten bei 30°.

| | Drehungsrückgang | Kohlensäureentwicklung |
|----------------------|------------------|------------------------|
| Ohne Toluol | 3,08° = 31,0% | 0,1990 = 20,0% |
| Mit 1 ccm Toluol . . | 0,41° = 4,2% | 0,0103 = 1,0% |

Frische Hefe spaltet aber Maltose je nach Art und Vorbehandlung. Bei einem Versuch mit sehr kräftiger Bierhefe, welche ich selbst in Pasteurschen-Kolben auf mit Maltose versetztem Hefewasser gezüchtet habe, verlief die Maltosespaltung anscheinend etwas schneller als die Gärung. In den

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 28, S. 1429, 1895.

meisten Fällen aber waren die Resultate zweifelhaft. Wir führen beispielsweise folgenden Versuch an:

In 25 ccm 8%iger Maltoselösung 1 g abgepreßte Hefe.
Reaktionszeit: 5 Stunden bei 20°.

| | Drehungsrückgang | Kohlensäureentwicklung |
|----------------------------|------------------|------------------------|
| Ohne Toluol | 4,10° = 42,0% | 0,2643 g = 27,0% |
| Mit 1 ccm Toluol | 0,52° = 5,3% | 0,0170 g = 1,7% |

Nun betragen zwar in den beiden letzten Versuchen die entwickelten Mengen CO₂ 20 und 27 bzw. 1 und 1,7% der bei vollständiger Reaktion auftretenden Kohlensäure, während der Drehungsrückstand 31 und 42, bzw. 4,2 und 5,3% beträgt. Indessen zeigt sich eine derartige Differenz auch stets bei der Vergärung der Glukose und beruht, wie in einer folgenden Mitteilung näher gezeigt werden wird, auf der Bildung eines Zwischenproduktes.¹⁾

In Übereinstimmung mit Morris²⁾ und mit E. Fischer fand ich, daß Chloroform die Maltosespaltung ebenso vollständig aufhebt wie die Gärung. Bei Gegenwart von Toluol, Äther und anderen antiseptischen Mitteln findet nach Fischer Maltosespaltung statt. Immerhin wird schon durch Zusatz von Toluol die Maltosespaltung der lebenden Hefe sehr stark herabgedrückt, wie z. B. obiger Versuch zeigt.

In bezug auf Dauerhefe gibt Fischer an: «War die Hefe trocken, so geht die Hydrolyse des Disaccharides (der Maltose) leicht vonstatten. Unter diesen Umständen wird eben das Enzym gelöst, wovon ich mich durch einen besonderen Versuch mit gesättigtem Chloroformwasser überzeugt habe.»

III. Invertase.

Die chemische Dynamik der Rohrzuckerspaltung durch lebende Hefe haben wir in einer vorhergehenden Mitteilung studiert. Diese Zeitschrift, Bd. 71, S. 14, 1911.

Durch Wasser läßt sich Invertase aus frischen Hefezellen bei gewöhnlicher Temperatur bekanntlich nur in sehr geringem

¹⁾ Proc. Chem. Soc., 1895, S. 46.

²⁾ H. Euler und A. Fodor, Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 4, 1911.

Maß auslaugen; schon bei 50° kann aber aus frischer Hefe viel aktive Invertase direkt extrahiert werden. Noch vollständiger ist die Extraktion, wenn die Hefe nach den bekannten Verfahren vor der Extraktion entwässert wird.

Wir haben einen hierauf bezüglichen quantitativen Versuch angestellt.¹⁾

Es lagen bis jetzt keine Angaben darüber vor, wie viel von der invertierenden Fähigkeit der Hefe erhalten bleibt, wenn frische Hefe vorsichtig im Vakuum getrocknet wird.

0,25 g lebende, abgepreßte Hefe in 25 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung bei 20°. Wassergehalt der Hefe: 57,3%.

Tabelle 2.

| Minuten | Drehung | a—x | k · 10 ⁴ |
|---------|---------|------|---------------------|
| 0 | 4,07 | 5,37 | — |
| 15 | 1,38 | 2,68 | 201 |
| 25 | 0,45 | 1,75 | 195 |
| 35 | —0,03 | 1,27 | 180 |
| ∞ | —1,30 | — | — |

0,1 g getrocknete Hefe in 25 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung bei 20°.

¹⁾ 5 g Trockenhefe wurden während 12 Stunden mit 100 ccm Wasser extrahiert. 5 ccm dieses Extraktes wurden mit 20 ccm 10%iger Rohrzuckerlösung und 5 ccm 5%iger NaH₂PO₄-Lösung gemischt. Mit dieser Lösung wurde die Inversionskonstante

$$k \cdot 10^4 = 48$$

erhalten. Dies entspricht einer extrahierten Hefemenge von 0,25 g. Nach obiger Tabelle würde die entsprechende Menge getrockneter Hefe in 25 ccm der gleichen Rohrzuckerlösung eine Inversionskonstante

$$k \cdot 10^4 = 220$$

liefern. Durch Extraktion der Trockenhefe mit dem 20-fachen Gewicht Wasser geht also etwa ein Viertel ihres Invertasegehaltes in Lösung.

Da ferner beim Trocknen der Hefe etwa die Hälfte der invertierenden Wirkung erhalten bleibt (siehe unten), so ergibt sich, daß nach der üblichen Extraktionsmethode etwa $\frac{1}{8}$ des Invertasesystems in die wässrige Lösung übergeht.

Tabelle 3.

| Minuten | Drehung | a—x | k · 10 ⁴ |
|---------|---------|------|---------------------|
| 0 | 4,07 | 5,37 | — |
| 17 | 2,41 | 3,71 | 94 |
| 26 | 1,81 | 3,21 | 86 |
| 37 | 1,32 | 2,62 | 84 |
| ∞ | —1,30 | — | — |

Rechnet man die Konstanten auf Grund des oben angegebenen Wassergehaltes auf gleiche Hefemengen um, so ergibt sich:

| | |
|------------------------|---------------------|
| | k · 10 ⁴ |
| Frische Hefe | 192 |
| Getrocknete Hefe . . . | 88 |

Es bleibt also etwa die Hälfte der Invertase beim Entwässern erhalten. Zum Vergleich sei erwähnt, daß die gleiche Hefe bei derselben Trocknung nicht mehr als etwa $\frac{1}{20}$ ihrer Gärwirkung behielt.

Zusatz von Chloroform, Toluol und Thymol ist fast ganz ohne Einfluß auf die invertierende Wirkung der Hefe. Dies geht aus folgendem Versuch hervor, der mit 10%iger Rohrzuckerlösung bei 20° angestellt worden ist.

| | |
|----------------------|---------------------|
| | k · 10 ⁴ |
| Mit Chloroform . . . | 94 |
| Ohne » . . . | 96 |

Ebenso ist die Invertase der getrockneten Bierhefe gegen Zusatz von Giften unempfindlich.

Anders als in gewöhnlicher Hefe verhält sich die Invertase in *Monilia candida*. Dieselbe ist ebenfalls von E. Fischer studiert worden. Er gibt an: «Frische *Monilia* spaltet in Gegenwart von antiseptischen Mitteln Rohrzucker nicht. Trocknet man die *Monilia*zellen, so tritt auch in Gegenwart von antiseptischen Stoffen Spaltung ein».

Die obigen Ergebnisse stellen wir jetzt in einer Tabelle zusammen.

Tabelle 4.

| | | Zymase | Monilia- invertase | Maltase | Bierhefen- invertase |
|------------------|--|----------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| Lebende Hefe | Relative Reaktions- geschwindigkeit in 8%iger Zuckerrösung | 1 | 1 (bis 2) | 1 (bis 2) | 170 |
| | Extrahierbarkeit . . | 0 | 0 | 0 | Gering |
| | Giftwirkung: | | | | |
| | Chloroform . . . | Hemmt vollständig | Hemmt vollständig | Hemmt vollständig | Schwächt fast nicht |
| | Thymol | » | » | Schwächt sehr stark | Schwächt nicht |
| | Toluol | » | » | Schwächt sehr stark | » |
| Trocken- hefe | Schwächung beim Trocknen | 20 : 1 | 25 : 1 | — | 2 : 1 |
| | Extrahierbarkeit . . | Sehr gering | Sehr gering | Sehr unvoll- ständig | Etwa 20 % |
| | Giftwirkung: | | | | |
| | Chloroform . . . | Schwächt | — | — | Schwächt nicht |
| | Toluol | Schwächt | Schwächt | Schwächt | Schwächt nicht |

In erster Linie fällt in vorstehender Tabelle der kontinuierliche Übergang im Verhalten der verschiedenen Hefenenzyme auf.

Hinsichtlich der «Zymase» wurde früher der Schluß gezogen, daß dieselbe (zum größten Teil) mit dem Protoplasma verbunden ist, und von demselben durch Entwässern mehr oder weniger vollständig abgetrennt wird. Nun lassen sich die über die Hefenenzyme oben mitgeteilten Tatsachen durch folgende erweiterte Arbeitshypothese zusammenfassen:

Die Hefenenzyme sind ursprünglich Bestandteile des Plasmas und werden entweder schon in der lebenden Zelle vom Plasma abgeschieden und dann am Plasma wieder regeneriert; sie sind dann relativ leicht extrahierbar und sind in relativ großer Menge in den Zellen vorhanden. Oder aber die Abtrennung erfolgt erst (teilweise) beim Entwässern der Hefe oder durch mechanische

Mittel, überhaupt unter den Umständen, unter welchen das Plasma getötet wird. Gegen Antiseptika sind die Hefenenzyme in dem Maße unempfindlich, als sie vom lebenden Plasma befreit sind.

Hierzu sind folgende Erläuterungen zu fügen:

Man könnte einwenden, daß die «Zymase» der Dauerhefe, welche vom lebenden Plasma befreit ist, sich etwa im selben Grad wie die «Maltase» extrahieren lassen sollte. Dies scheint tatsächlich der Fall zu sein. Ich ließ sorgfältig getrocknete Brauereihefe mit der doppelten Menge Wasser 24 Stunden stehen und filtrierte dann. Das Filtrat zeigte deutliche, wenn auch geringe Gärung. Aus 20 ccm Filtrat entwickelten sich bei 30° in 24 Stunden 10 ccm CO₂. Bei anderen Hefen gelingt die Extraktion vielleicht besser.¹⁾

Die in obiger Tabelle angegebenen Reaktionsgeschwindigkeiten können natürlich in verschiedenen Hefen schwanken; es sind Mittelwerte, welche nur zur allgemeinen Orientierung dienen sollen. Auch ist die Größe dieser Reaktionsgeschwindigkeit kein genaues Maß für die Enzymmengen, da ja die verschiedenen Reaktionen bei gleicher Katalysatormenge verschieden rasch verlaufen. Immerhin zeigt sich deutlich, daß in der gewöhnlichen Bierhefe viel mehr Invertase als Maltase vorhanden ist.

Bei Monilia liegen die Verhältnisse anders: Hier bleibt das Enzym in der lebenden Zelle an das Plasma gebunden, wird infolge dessen nicht regeneriert und die invertierende Wirkung ist demgemäß sehr gering (andererseits ist das Enzym fast nicht extrahierbar und wird durch Antiseptika gehemmt). Die unbedeutende invertierende Wirkung der Moniliazellen geht aus folgenden quantitativen Versuchen hervor: Die Hefe entstammt dem Berliner «Institut für Gärungsgewerbe» und wurde hier auf Hefewasser unter Maltosezusatz gezüchtet; es kam eine 14 Tage alte Kultur zur Verwendung.

¹⁾ Seit der Ausführung dieser im Februar 1911 veröffentlichten Versuche ist A. v. Lebedew zu ähnlichen Ergebnissen gekommen (Compt. rend., Bd. 152, S. 49, 1911). Wir verweisen auf die interessante Mitteilung dieses Forschers.

Sämtliche Zuckerlösungen sind 8%ig und enthalten 0,5 g frische Moniliahefe in 25 ccm. Temp. 30°.

Wassergehalt der Hefe: 60,3%.

Tabelle 5.

| | Reaktions- zeit Minuten | Drehung | Drehungs- rückgang | Entwickelte CO ₂ |
|------------------------|-------------------------------|---------|-----------------------|--------------------------------|
| Glukose | 0 | 4,34° | | |
| » | 187 | 3,43° | 0,91° = 20,97% | 0,0660 g = 6,60% |
| Maltose | 0 | 9,90° | | |
| » | 185 | 9,50° | 0,40° = 6,55% | 0,0220 g = 2,20% |
| Saccharose | 0 | 5,08° | | |
| » | 181 | 4,71° | 0,37° = 5,51% | 0,0400 g = 4,0% |
| » andere . | 0 | 5,08° | | |
| » Moniliakultur | 180 | 4,65° | 0,43° = 6,41% | 0,0500 g = 5,0% |
| » Mycoderma | 0 | 5,08° | | |
| der gleichen Kultur | 200 | 4,65° | 0,43° = 6,41% | 0,0550 g = 5,5% |

Von Monilia wird also Glukose am schnellsten vergoren, Maltose am langsamsten. Von gewöhnlicher Bierhefe wird im allgemeinen Maltose etwa ebenso schnell vergoren wie Glukose und Rohrzucker.

In einer vorhergehenden Mitteilung¹⁾ wurde gezeigt, daß die Gärung lebender Hefe durch Vorbehandlung mit verdünnter ($\frac{2}{3}$ —1%iger reiner oder neutralisierter) Monophosphatlösung nicht wesentlich beeinträchtigt wird, während die Vorbehandlung mit stärkeren Monophosphatlösungen eine deutliche Schwächung hervorruft.

Wird Trockenhefe mit 2%iger KH_2PO_4 -Lösung vorbehandelt, so zeigt sich gegenüber einem mit Wasser digerierten Präparat eine deutliche Schwächung.

Versuch:

1. 10 g Trockenhefe wurden während 3 Stunden mit 100 ccm Wasser digeriert, abgesogen und auf Ton getrocknet.

¹⁾ H. Euler u. S. Kullberg, Diese Zeitschrift, Bd. 71, S. 14, 1911.

2. 10 g Trockenhefe wurden während 3 Stunden mit 100 ccm 2 % iger KH_2PO_4 -Lösung behandelt. Filtration und Trocknen wie bei 1.

Je 1 g der nach 1 und 2 vorbehandelten Hefe wurden mit 25 ccm 8 % iger Glukoselösung versetzt. Gärungstemperatur $30,6^\circ$.

Durch Vorbehandlung unserer Hefe mit Rohrzuckerlösungen wird die weitere Gärkraft der Hefe nicht beeinflusst. Gärt hingegen die Hefe in Gegenwart von Phosphat, so zeigt sich dann die Gärkraft unserer Hefe verstärkt.¹⁾

Es kann angenommen werden, daß hier der günstige Einfluß des Phosphates mit dem konstanten Phosphatgehalt in der Hefe zusammenhängt. Wir haben in folgenden Versuchen die Hefe in Gegenwart anderer Bestandteile ihrer Asche, nämlich in Gegenwart von Mg-, Ca- und SO_4 -Ionen, vergären lassen.

Versuche: 30 g Hefe H vergären während 2 Stunden 300 ccm einer 10 % igen Rohrzuckerlösung, unter Zusatz von:

- I. 1,5 g MgSO_4 ,
- II. 1,5 g CaCl_2 ,
- III. CaSO_4 (gesättigte Lösung).

Der Parallelversuch ohne Zusatz ist mit IV bezeichnet.

Das Resultat geht aus den Kurven der Fig. 5 hervor. Von den drei Salzen beschleunigte nur

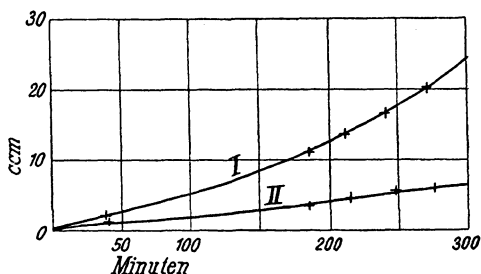


Fig. 4.

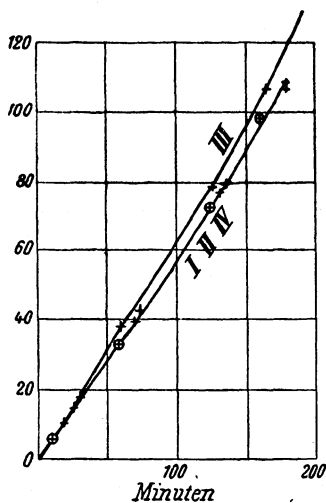


Fig. 5.

¹⁾ Euler und Lundeqvist, Diese Zeitschrift, Bd. 72, 1911.

Vgl. hierzu die zahlreichen Versuche von Lange (Woch. f. Brauerei, 1907).

das CaSO_4 die Gärung. Wird eine 10%ige Glukoselösung durch 0,5 g abgepreßte Hefe H bei 30° mit der Geschwindigkeit 1 vergoren,¹⁾ so beträgt die Gärungsgeschwindigkeit, wenn die gleiche Lösung 2%ig in bezug auf NaH_2PO_4 ist, $k = 1,4$.

Wird die gleiche Hefe getrocknet, so ist die Beschleunigung erheblich größer, wie der folgende Versuch zeigt; bei welchem die Lösung a in bezug auf NaH_2PO_4 1%ig war, während die Lösung b kein Phosphat enthielt.

Unmittelbar nach der letzten Ablesung wurde die Drehung der Lösung ermittelt, um die Menge des in der Zeit t verschwundenen Zuckers mit der Menge der in der gleichen Zeit entwickelten Kohlensäure zu vergleichen. Solche Vergleiche hat der eine von uns mit lebender Hefe angestellt; sie gaben einen Aufschluß über die Menge der in der Lösung anwesenden Zwischenprodukte.²⁾

Tabelle 6.

| Minuten | ccm CO_2 | | In % der gesamten CO_2 | | Drehung | | Drehungsänderung in % | |
|---------|-------------------|------|---------------------------------|------|---------|------|-----------------------|------|
| | a | b | a | b | a | b | a | b |
| 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,15 | 2,15 | 0,0 | 0,0 |
| 300 | 29,0 | 16,2 | — | — | — | — | — | — |
| 400 | 36,5 | 19,5 | — | — | — | — | — | — |
| 1320 | 77,0 | 34,0 | 14,38 | 6,35 | 1,82 | 2,03 | 15,82 | 5,12 |

Die Differenz zwischen der entwickelten CO_2 und dem umgewandelten Zucker ist hier auffallenderweise sehr viel geringer als bei der Gärung mit lebender Hefe, wo zuweilen die Drehungsänderung das Doppelte des aus den entwickelten Kohlensäuren theoretisch berechneten Wertes beträgt. Wir behalten uns die Erweiterung und Berechnung dieser Versuche auf eine folgende Mitteilung vor.

¹⁾ H. Euler und G. Lundeqvist, Diese Zeitschrift, Bd. 72, 1911.

²⁾ H. Euler und A. Fodor, Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 4, 1911.